

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE ARAÇÁ-VERMELHO (*PSIDIUM CATTLEYANUM* SABINE)

Queli Defaveri Varela Cabanellos¹, Daisy Bassanesi Brandalise²,
Jonathan Parisotto-Peterle³, Fabiana Agostini⁴, Lucas Colombo Colissi⁵,
Valeria Weiss Angeli⁶

Resumo: O potencial terapêutico dos produtos do metabolismo secundário de espécies vegetais tem sido alvo de pesquisas e desenvolvimento de produtos farmacêuticos inovadores. O Brasil apresenta uma natureza exuberante, que se destaca pelo grande número de compostos bioativos com propriedades físico-químicas de interesse cosmético e medicinal. O araçá-vermelho (*Psidium cattleyanum* Sabine) possui quantidades significativas de compostos fenólicos que oferecem ações antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. No entanto, os compostos fenólicos possuem baixa estabilidade e incompatibilidade química, o que dificulta a sua utilização em formulações convencionais. Uma alternativa inovadora é a utilização

-
- 1 Farmacêutica com habilitação para Análises Clínicas e Toxicológicas, Mestre em Biotecnologia e Doutoranda em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul (UCS), RS, Brasil. Docente do Centro Universitário UNIFTEC, E-mail: quimfarm@gmail.com
 - 2 Farmacêutica, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil. E-mail: daisybbrandalise@gmail.com
 - 3 Farmacêutico, Mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: jonathanparisotto@gmail.com
 - 4 Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas, Mestre em Biotecnologia, Doutora em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil. E-mail: fagosti1@ucs.br
 - 5 Acadêmico do curso de Biomedicina, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil. Email: lccolissi@ucs.br
 - 6 Farmacêutica com habilitação em Indústria de Medicamentos, Mestre em Ciências Farmacêuticas e Doutora em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; Docente do Curso de Farmácia e Pesquisadora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Vida da Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil. E-mail: vwangeli@ucs.br

do óleo essencial da espécie vegetal em nanoemulsões, que são caracterizadas como dispersões nanométricas, nas quais as gotículas oleosas (compreendidas na fase interna) são estabilizadas por um sistema de tensoativos, e contidas em um ambiente aquoso (fase externa). Além disso, as nanoemulsões possuem diversas vantagens em relação aos sistemas tradicionais, onde a substância ativa encontra-se livre, como: aumento da estabilidade do princípio ativo, aumento da eficácia e desenvolvimento de características sensoriais diferenciadas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nanoemulsão contendo o óleo essencial do araçá-vermelho. As formulações foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea, seguido, ou não, de homogeneização por alta pressão, com o intuito de avaliar as melhores condições de preparação. Além disso, as nanoemulsões foram caracterizadas de acordo com o pH, tamanho de gotícula, potencial zeta e índice de polidispersão. As amostras submetidas à técnica de emulsificação espontânea apresentaram tamanho de gotícula médio de 432,67 nm ($\pm 121,07$), índice de polidispersão de 0,65 ($\pm 0,128$) e potencial zeta de -24,63 mV ($\pm 0,6807$), e, quando associado à homogeneização a alta pressão, apresentaram tamanho de gotícula médio de 230,23 nm ($\pm 3,81$) índice de polidispersão de 0,316 ($\pm 0,037$) e potencial zeta de -21,57 mV ($\pm 0,1528$). Desta forma, pode-se perceber que a associação dos métodos de emulsificação espontânea e homogeneização a alta pressão foram essenciais para a obtenção de nanoemulsões com maior estabilidade que poderão ser utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Compostos fenólicos. Tecnologia de cosméticos. Óleos voláteis. Compostos fitoquímicos.

1 INTRODUÇÃO

A busca por princípios ativos naturais com o objetivo de diminuir a produção de resíduos, conexão com a natureza e a escolha de um estilo de vida mais saudável é uma forte tendência no mercado farmacêutico (Saretta; Brandão, 2021). A natureza por sua vez, oferece substâncias bioativas nas mais diversas aplicações, cujo grande desafio dos pesquisadores consiste em compreender este universo fitoquímico e elaborar produtos que alinhem a tecnologia aos benefícios farmacológicos potenciais (Rocha *et al.*, 2021).

O araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) é uma espécie vegetal nativa do Brasil, pertencente à família *Myrtaceae*, conhecida popularmente como araçá, araçá-do-mato, araçá-vermelho, araçá-do-campo, dentre outros (Rocha *et al.*, 2008; Fetter *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2018). Além do seu potencial nutricional, sendo uma fruta consumida *in natura* e sob a forma de geleias e sorvetes, estudos relataram atividades antioxidante, antiproliferativa e antimicrobiana (Medina *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2021). Além disso, a atividade do araçá-vermelho em inibir enzimas digestivas, faz deste fruto também um potencial aliado no tratamento para a obesidade (Pereira *et al.*, 2021).

A alta atividade antioxidante desta espécie vegetal ocorre devido a presença de flavonoides, taninos, saponinas, antraquinonas e óleos essenciais (Biegelmeier *et al.*, 2011; Desoti *et al.*, 2011; Jun *et al.*, 2011; Medina *et al.*,

2011; Müller *et al.*, 2012). Estes são misturas complexas de compostos voláteis lipofílicos, de baixo peso molecular, que compreendem princípios ativos responsáveis por diversas aplicações terapêuticas (Simões *et al.*, 2004), onde a atividade farmacológica depende de sua composição química, a qual pode diferir amplamente.

De modo geral, os óleos essenciais são pouco estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (Simões *et al.*, 2004; Külkamp, 2009). Logo, a busca por sistemas mais estáveis que auxiliem na manutenção de suas características é relevante. A nanotecnologia aplicada aos medicamentos resulta em estruturas nanométricas (1×10^{-9} m) capazes de contribuir com a atividade de alguns fármacos, solucionando, muitas vezes, problemas de baixa solubilidade em água, biodistribuição inespecífica e baixa biodisponibilidade que acarreta em baixa concentração do princípio ativo no sítio específico (Sawant, Torchilin, 2012; Dimer *et al.*, 2013). Os nanocarreadores são capazes de transportar o fármaco para um local de destino específico para exercer sua atividade terapêutica com o máximo de segurança (Dimer *et al.*, 2013). Além disso, são capazes de proteger os ativos associados contra a degradação enzimática, reduzindo, portanto, a dose terapêutica necessária e o risco da toxicidade dose-dependente (Lim, Banerjee, Önyüksel, 2012; Apolinário *et al.*, 2020).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

As nanoemulsões (NE) são caracterizadas por serem dispersões coloidais monofásicas, de transparentes a leitosas, opticamente isotrópicas e cineticamente estáveis, compostas pela associação de óleo, água, emulsionantes e co-emulsionantes, obtendo tamanhos de gotículas inferiores a 100 nm (Nastiti *et al.*, 2017). Embora a literatura apresente tamanhos diferentes de gotículas para as NE, tem-se referências de tamanhos entre 50 e 200 nm (Tadros *et al.*, 2004), e entre 20 e 500 nm (Forgiarini *et al.*, 2001). As NE, embora possuam uma boa estabilidade cinética, não são termodinamicamente estáveis, podendo estar sujeitas à separação de fases ao longo do tempo. Assim, as técnicas utilizadas na obtenção de NE geralmente envolvem metodologias de alta e baixa energia (Gupta *et al.*, 2016).

Dentre as técnicas empregadas para a preparação de NE, destacam-se a microfluidização, a homogeneização a alta pressão e a sonicação, como métodos de alta energia; e a emulsificação espontânea e a inversão de fases de temperatura, como métodos de baixa energia (Almeida, Teixeira, Koester, 2008).

O método de emulsificação espontânea ocorre quando uma fase orgânica e uma fase aquosa são misturadas. A fase orgânica é uma solução homogênea de óleo, agente tensoativo lipofílico e solvente miscível com água; enquanto a fase aquosa consiste em água e um tensoativo hidrofílico. A adição da solução

óleo-solvente na fase aquosa resulta na emulsificação das nanogotículas da fase oleosa, devido à instabilidade interfacial, este efeito é conhecido como efeito *Marangoni*, originada da rápida difusão do solvente através da interface, diminuindo, conseqüentemente, a tensão interfacial (Bouchemal *et al.*, 2004).

Já a homogeneização a alta pressão consiste em um método no qual uma emulsão grosseira é forçada a passar, sob alta pressão, através de um orifício de diâmetro extremamente pequeno. Neste processo, há um aumento na velocidade que acarreta uma diminuição da pressão. A energia liberada gera uma turbulência e as diferenças de pressão localizadas causam o rompimento e conseqüente redução no tamanho das gotículas. O emprego de sistemas emulsionantes adequados, que estabilizem a nova interface formada, é essencial. Este processo é vantajoso por permitir diferentes escalas de produção, entretanto, pode ser desfavorável pelo fato dos custos envolvidos nestes processos serem elevados (Almeida, Teixeira, Koester, 2008; Oliveira, 2008; Bruxel, 2012; Borrin, 2015).

Dentre as diferentes matérias-primas utilizadas na preparação das NE, os emulsionantes (tensoativos) desempenham um papel fundamental na preparação e estabilidade destes sistemas. Além disso, o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) representa um sistema de classificação de tensoativos baseado em parâmetros da solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou apolares e representa o máximo de estabilidade do sistema. No valor de EHL requerido para NE, o tamanho do glóbulo é mínimo, o que explica a estabilidade do sistema (Zanin, 2002; Oliveira, 2008). Nas NE, a fase oleosa pode ser constituída sobretudo por óleos vegetais fixos ou voláteis e normalmente é estruturada com base na solubilidade do fármaco (ou substância bioativa) a ser veiculado, na sua estabilidade, bem como na estabilidade da formulação desenvolvida. No presente trabalho, além do óleo essencial de araquá-vermelho, utilizou-se na fase interna da gotícula o óleo de melaleuca como solubilizante oleoso devido às suas atividades antibacteriana e anti-inflamatória. O óleo de melaleuca é um líquido límpido que apresenta odor distinto, rico em monoterpenos, sendo que, dentre seus mais de 100 componentes, o mais abundante é o terpinen-4-ol, que compõe aproximadamente 40% do óleo. Estudos realizados com este óleo mostraram efetividade frente a diversas patologias, dentre elas acnes superficiais e candidíase oral (Forrer *et al.*, 2013).

As NE, por serem sistemas dispersos, apresentam instabilidade físico-química, portanto, a sua caracterização constitui uma importante ferramenta na avaliação de sua estabilidade. De acordo com a literatura, os testes para caracterização das NE incluem a determinação do tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e pH. Na determinação do tamanho médio das gotículas avalia-se o diâmetro das mesmas. A homogeneidade de tamanho entre as gotículas (índice de polidispersão) avalia a presença de populações com diferentes tamanhos de gotículas na mesma formulação. Alterações destes resultados podem sugerir uma tendência à formação de

agregados, precipitação ou sedimentação das gotículas que compõem o sistema (Júnior, 2011). Valores de PDI inferiores a 0,3 indicam homogeneidade entre o tamanho das gotículas; enquanto valores superiores a 0,3 indicam falta de uniformidade, podendo acarretar processos de unificação das gotículas e posterior separação de fases (Alves *et al.*, 2007; Vargas, 2010). O potencial zeta estima a carga superficial residual das gotículas dispersas em um campo carregado, através da mobilidade eletroforética. Um elevado valor de potencial zeta em módulo (> 30 mV) mostra-se imprescindível para a estabilidade físico-química das NE, uma vez que, forças repulsivas tendem a evitar fenômenos de instabilidade como floculação e/ou cremação. Quanto maior o potencial zeta, em módulo, mais provável que a suspensão esteja estável, pois as gotículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural de agregação (Franzol, Rezende, 2015).

A determinação do pH da NE, serve como indicativo para a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de emulsões formadas com óleos vegetais, a diminuição do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que originam ácidos graxos livres. Estes ácidos, reduzem o valor de pH das formulações, podendo, portanto, ser empregados como indicadores de estabilidade das NE frente a diferentes condições de armazenamento (Oliveira, 2008).

Considerando as propriedades acima destacadas, o objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar uma NE contendo óleo essencial de araquá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine), por emulsificação espontânea e avaliar a influência do método de tratamento utilizado nas características físico-químicas das formulações obtidas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e caracterização do óleo de araquá-vermelho

As amostras dos exemplares de coleta das folhas foram entregues ao Herbário da Universidade de Caxias do Sul (UCS) para identificação botânica, recebendo o número de identificação HUCCS 40753 e a identificação de *Psidium cattleianum* Sabine. O óleo de araquá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) foi obtido a partir de extração por hidrodestilação, utilizando aparelho de Clevenger®, pelo método citado por Mechkovski e Akerele (1992).

A caracterização do óleo, para identificação dos compostos majoritários, foi realizada por meio de cromatografia gasosa (Varian CP- 3800), conectado a um detector seletivo de massas *Hewlett Packard* 6890/MSD5973, e equipado com software *HP Chemstation* e especroteca *Wiley* 275. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m x 250 µm) e 0,50 µm de espessura do filme. A metodologia foi adaptada de Santos, Martendal e Carasek (2009), em que a rampa de temperatura do forno inicia a 60 °C (8 minutos), seguindo para

180 °C a 3 °C /minuto e 20 °C/minuto até 230 °C. As temperaturas do injetor e interface foram, respectivamente 220 °C e 250 °C; a razão de *split* foi de 1:100; o gás de arraste utilizado foi hélio (56 Kpa); com fluxo de 1 mL/min; e energia de ionização 70 eV.

3.2 Preparação das NE contendo óleo de araçá-vermelho (NE-OA)

As NE contendo óleo de araçá-vermelho, NE-AO, foram preparadas através do método de emulsificação espontânea, conforme metodologia citada por Oliveira (2008), sendo demonstradas nas Tabelas 1 e 2. A fase oleosa foi composta por óleo de melaleuca (INCI name: *Tea tree oil - Melaleuca alternifolia* - Fornecedor: CosmeTrade Insumos Farmacêuticos e Cosméticos) e o óleo essencial obtido das folhas do araçá-vermelho (INCI name: *Araçá oil - Psidium cattleyanum* Sabine) obtido pelo processo de hidrodestilação citado no item 3.1, no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS). Além disso, empregou-se o tensoativo monoestearato de sorbitano (Span60®, Fornecedor: Polytechno Indústrias Químicas) de EHL 4,7, e propanona (Fornecedor: Vetec Química Fina). A fase aquosa foi composta por monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween80®, Fornecedor: All Chemistry do Brasil) de EHL 15,0, e água (obtida por processo de destilação no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Universidade de Caxias do Sul (UCS)). Para a preparação das NE, ambas as fases foram aquecidas separadamente, a aproximadamente 75 °C ± 2, e em seguida a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa, lentamente, sob agitação vigorosa, até atingir a temperatura ambiente. Utilizou-se para agitação, o aparelho Ultra Turrax IKA T18 Basic, a uma velocidade de 6.000 rpm, durante 15 a 20 minutos.

Para o cálculo das quantidades de tensoativos hidrofílico e lipofílico necessários para a obtenção de cada valor do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) da NE foi utilizada a equação a seguir, de acordo com Griffin (1949):

$$EHL_{final} = (EHL_A \times 0,01 \times A + EHL_B \times 0,01 \times B)$$

Onde EHL_{final} é o valor de EHL resultante das misturas de tensoativos, onde A é a porcentagem do tensoativo hidrofílico; e B a porcentagem do tensoativo lipofílico, em que $A + B = 100$.

Muitos óleos vegetais não possuem valores de EHL determinados e sua classificação pode variar amplamente em função da composição individual de cada óleo. Para tanto, utilizou-se como referência o fato de que os valores de EHL dos óleos essenciais em geral encontram-se na faixa de 6,0 a 12,0 (Zanin *et al.*, 2002), e então, calculou-se a composição das formulações a partir da média destes valores, com EHL igual a 9,0.

Tabela 1 - Composição das formulações das nanoemulsões contendo óleo essencial de araquê morfotipo vermelho com e sem a adição de solvente orgânico (propanona)

Amostra	OM ¹	OA ²	Tween80 ^{®3}	Span60 ^{®4}	Propanona	Água	Volume Final*
NEOA 1	3%	0,1%	0,52%	0,73%	-	25,0 mL	10,0 mL
NEOA 2	3%	0,3%	2,09%	2,91%	10,0 mL	20,0 mL	10,0 mL
NEOA 3	3%	0,1%	2,09%	2,91%	10,0 mL	20,0 mL	10,0 mL
NEOA 4	3%	0,5%	2,09%	2,91%	10,0 mL	20,0 mL	10,0 mL
NEOA 5	3%	0,5%	1,25%	1,75%	10,0 mL	20,0 mL	10,0 mL

Legenda: ¹Óleo melaleuca; ²Óleo essencial de araquê; ³Monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween80[®]); ⁴Monoestearato de sorbitano (Span60[®]).

*Volume após evaporação

** Formulação NEOA 1 foi evaporada água para ajuste de concentração do OE

A evaporação foi realizada com o propósito de remoção do solvente orgânico e ajuste de concentração de óleo essencial de araquê (OA) nas NE. Ao final deste processo a concentração de OA nas formulações foi a seguinte: NEOA 1 e NEOA 3 (0,01 mg/ml), NEOA 3 (0,03 mg/mL e NEOA 4 e NEOA 5 (0,05 mg/mL).

Após a preparação, as amostras foram acondicionadas em frasco âmbar e posteriormente submetidas ao tratamento por homogeneização de alta pressão, utilizando o equipamento EmulsiFlex-C3[®], Avestin, Canadá, 6 ciclos, 750 bar, a 10.000 psi, obtendo assim as NE. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

3.3 Caracterização das formulações

3.3.1 Determinação de pH

O valor de pH, definido como a medida da atividade do íon hidrogênio de uma solução foi realizado em triplicata, por meio de um pHmetro digital, marca Micronal B474, previamente calibrado, a aproximadamente 20 °C, conforme Farmacopeia Brasileira 5^a edição (Anvisa, 2010).

3.3.2 Determinação do tamanho de gotícula e índice de polidispersão

O tamanho de gotícula e o índice de polidispersão (PDI) foram medidos em triplicata por espalhamento de luz dinâmico, a uma diluição de 10,0 µL da amostra em 10,0 mL de água ultrapura, com o auxílio do equipamento Zetasizer[®] Nanoseries ZN90, Malvern Instruments, Worcestershire, RU.

3.3.3 Determinação do Potencial Zeta

A determinação do potencial zeta foi realizada em triplicata por espalhabilidade de luz eletroforética, utilizando o mesmo instrumento mencionado na determinação do tamanho de gotícula e índice de polidispersão, após diluição de 10,0 µL da amostra em 10,0 mL em NaCl (1 mM) filtrado em filtro de 0,45 µm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a caracterização do óleo essencial de araquá foi utilizado um banco de dados informatizado contendo informações já existentes na literatura a respeito de um grande número de substâncias conhecidas (HP Chemstation e espectroteca Wiley 275), obtendo o cromatograma e as informações apresentadas na Figura 1 e Tabela 1. Dessa forma, pode-se observar como compostos majoritários do óleo essencial 1,8-cineol (33,78%), seguido alfa-terpineol (6,10%) e por alfa-limoneno (5,38%). Os resultados deste estudo, no entanto, corroboram com outro estudo no qual o composto 1,8-cineol (eucaliptol) foi um dos compostos majoritários do óleo essencial de folhas do araquá-vermelho (Rocha, 2019). Este achado é importantíssimo, pois o 1,8-cineol possui ação antioxidante, anti-inflamatória (Zhao *et al.*, 2014), tendo aplicabilidade para tratar doenças cardiovasculares, problemas digestivos, doenças respiratórias e mal de Alzheimer, embora sua baixa estabilidade, restrinja a aplicação clínica (Hoch *et al.*, 2023).

Figura 1. Espectro de Cromatógrafo Gasoso acoplado à espectrometria de massas (CG-MS) do óleo essencial de araquá (*Psidium cattleianum* Sabine), morfotipo vermelho.

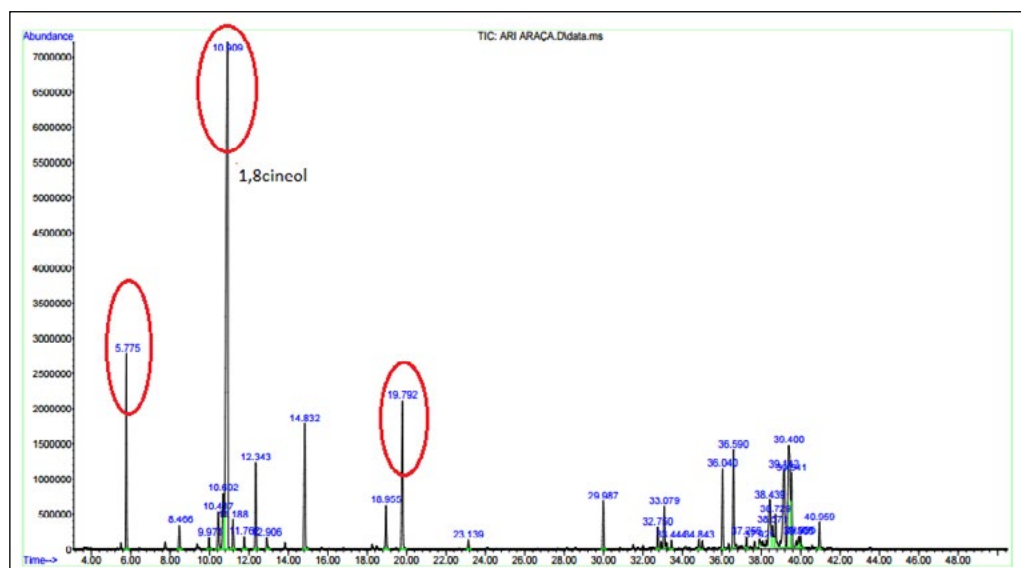


Tabela 2 - Composição química da fração enriquecida de β -cariofileno obtida por CG/MS, com os respectivos nomes dos compostos, tempos de retenção, índices de retenção e concentrações.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Concentração (%)	Índice de Retenção (LPTRI)	Nome do composto
1	6,054	0,105	960	Thuja-2,4-dieno*
2	6,252	0,473	963	1,4-ctil-metil-benzeno*

Na primeira formulação testada com óleo de araquá (NEOA 1), não foi adicionado solvente orgânico (propanona) em sua composição, com o intuito de evitar o uso deste componente devido a sua toxicidade e impacto ambiental (Tabela 1). Com o objetivo de avaliar o impacto dos métodos de preparação das NE, foram realizados os testes de caracterização de tamanho de gotícula, PDI e potencial zeta em duas condições: uma apenas com o processo de emulsificação espontânea (NEOA 1) e outra com a associação dos métodos de emulsificação espontânea seguido de homogeneização a alta pressão (NEOA-H 1) cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados dos testes de caracterização da formulação proposta da nanoemulsão de óleo de araquá (*Psidium cattleyanum* Sabine - *Myrtaceae*) morfotipo vermelho: Tamanho de Gotícula (nm), Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (mV) testada sem o uso de solvente orgânico.

Identificação da Amostra	Tamanho de Gotícula (nm)			PDI			Potencial Zeta (mV)		
		±			±			±	
NEOA 1	432,67	±	121,07	0,650	±	0,128	-24,63	±	0,6807
** NEOA-H 1	230,23	±	3,81	0,316	±	0,037	-21,57	±	0,1528

* Amostra NEOA 1 antes do processo de homogeneização

** Amostra NEOA-H 1 após processo de homogeneização

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3, é possível identificar a formação de um sistema nanoemulsionado utilizando o óleo essencial de araquá sem a adição de solvente orgânico, a NEOA 1, uma vez que o tamanho de gotícula obtido é compatível com o que a literatura preconiza para as NE (Anton, Benoit, Saulnier, 2008; Chime, Kenechukwu, Attama, 2014). Entretanto, sabe-se que as NE com diâmetro de glóbulos inferiores a 100 nm são mais estáveis e podem apresentar maior biodisponibilidade do ativo associado, e assim, justifica-se a necessidade da utilização de um método associado para a formação das NE. Conforme verificado na Tabela 3, a NEOA 1 apesar de apresentar um tamanho de partícula compatível com a escala de uma NE, pode sofrer processo de coalescência, por apresentar resultados superiores a

100 nm e um elevado PDI (0,650) indicando uma falta de uniformidade entre o tamanho das gotículas.

Já para a formulação NEOA-H 1, apesar de possuir um tamanho de partícula um pouco superior a 100 nm, este foi reduzido pela metade quando comparado com o NEOA 1, além de reduzir o valor de PDI (0,316) indicando uniformidade entre o tamanho das partículas. A partir da avaliação dos resultados, percebe-se que o processo de homogeneização a alta pressão foi bastante benéfico para a NE. O índice de polidispersão refere-se à uniformidade de distribuição dos tamanhos de gotículas, em que quando menores que 0,7 indicam homogeneidade no tamanho das gotículas e quando menores que 0,2, de acordo com as especificações do fabricante Malvern, indicam amostras monodispersas (Ourique *et al.*, 2010).

O potencial zeta, decorrente da presença, principalmente, dos tensoativos, indica a carga residual superficial da gotícula, estando diretamente relacionado à repulsão eletrostática entre os glóbulos dispersos próximos. Neste caso, o valor foi negativo, sendo um bom indicador de repulsão das gotículas e estabilidade da NE. Este resultado foi melhor evidenciado na formulação que não sofreu o processo de homogeneização, entretanto, ambos os resultados se situam abaixo do limite considerado ideal para NE (-30mV). Todavia, o desvio padrão desse teste diminuiu consideravelmente, demonstrando que o processo de homogeneização a alta pressão realmente é eficaz na formação de gotículas diminutas e de tamanhos semelhantes. O método de homogeneização de alta pressão já foi utilizado no preparo de NE de óleo de laranja em água (Kourniatas *et al.*, 2010), e para a obtenção de NE de óleo de oliva (Yukuyama, 2017).

Para fins de comparação e visando a obtenção de formulações com características físico-químicas mais estáveis, novas formulações foram propostas. Modificou-se a concentração do óleo essencial de araquá-vermelho e dos tensoativos, bem como optou-se pela adição de propanona (solvente orgânico) à formulação. O solvente orgânico tem por objetivo melhorar a difusão das gotículas na água, de maneira que os constituintes destas gotículas, por não serem solúveis em água, se auto estruturam em uma fase dispersa (Klein, 2013). O preparo seguiu a metodologia descrita anteriormente, adicionando a técnica de evaporação do solvente em rota-vapor e ajuste de volume, quando necessário.

Macroscopicamente, todas as formulações apresentaram homogeneidade de conteúdo após 24 horas de preparação. Os testes de caracterização preconizados por este estudo, como tamanho de gotícula, PDI e potencial zeta foram realizados com todas as novas formulações. A composição das formulações preparadas está descrita na Tabela 1. As amostras foram submetidas à homogeneização por alta pressão, tendo em vista os resultados obtidos nos testes precedentes à homogeneização e a busca por uma formulação mais estável. Os resultados dos testes antes e após homogeneização estão listados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 – Resultados dos testes de caracterização da formulação proposta da nanoemulsão de óleo de araquá (*Psidium cattleianum* Sabine) morfotipo vermelho: Tamanho de Gotícula (nm), Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (mV) testada com o uso de solvente orgânico antes de serem submetidas ao processo de homogeneização realizadas em triplicata

Identificação da Amostra	Tamanho de Gotícula (nm)			PDI			Potencial Zeta (mV)		
		±			±			±	
NEOA 2	549,40	±	71,84	0,926	±	0,095	-21,67	±	0,3055
NEOA 3	666,15	±	169,92	0,819	±	0,080	-28,40	±	0,3464
NEOA 4	887,95	±	442,72	0,922	±	0,068	-27,37	±	0,6658
NEOA 5	773,80	±	44,12	0,896	±	0,145	-23,07	±	0,5033

Observando a composição das formulações NEOA 2 e NEOA 3 percebe-se que apenas o ajuste do volume final da evaporação foi realizado, concentrando mais os tensoativos, de 69,67 g/L para 209 g/L, respectivamente.

Na formulação NEOA 3 o tamanho das gotículas aumentou quando a concentração final da formulação também aumentou, elevando, também, o desvio padrão associado. Entretanto, o PDI se contrapõe, na medida em que diminuiu em relação a NEOA 2. O potencial zeta aumentou quando houve maior homogeneidade de tamanho das gotículas. Esse parâmetro demonstra a carga eletrostática superficial das gotículas, a qual provém da dissociação de grupos funcionais do polímero, ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso do sistema (Franzol, Rezende, 2015), concordando com estudos apresentados pela literatura, já que, em módulo, um valor relativamente alto de potencial zeta representa uma boa estabilidade de NE, assim como tamanhos diminutos de gotículas dispersas. É possível inferir que um aumento na concentração de tensoativos na formulação foi satisfatório para obtenção de um sistema com PDI e potencial zeta mais adequados.

A formulação NEOA 4 foi produzida com metade da concentração de óleo essencial de araquá-vermelho utilizada nas anteriores, NEOA 2 e NEOA 3, tendo o mesmo volume final que a última. Os resultados, entretanto, não foram satisfatórios, tendo apresentado tamanho de gotículas e desvio padrão maiores, assim como o PDI, o qual caracteriza a amostra sem homogeneidade no tamanho das gotículas. Entende-se que uma maior concentração de óleo essencial auxilia nas propriedades ideais da formulação, podendo abranger maiores faixas de trabalho. Contudo, nessas condições, a toxicidade do óleo deve ser rigorosamente avaliada.

Percebe-se que as duas formulações que utilizaram concentração de óleo essencial de araquá mais elevada (0,5%) (NEOA 4 e NEOA 5), apresentaram tamanhos de gotículas maiores, sendo que a NEOA 4 apresentou desvio padrão extremamente elevado ($\pm 442,72$). Das três amostras preparadas com o

mesmo volume final, a que apresentou os melhores resultados foi a NEOA 3, com menor tamanho de gotícula e PDI, assim como maior carga de superfície residual indicando repulsão entre as gotículas. É importante verificar que os ácidos graxos poderiam atuar como co-emulsionantes, agindo como um fator de estabilidade da formulação, esse efeito foi observado em formulações com o óleo de mamona (Jumaa; Müller, 1998).

A amostra NEOA 5 foi calculada com porcentagem de tensoativos de apenas 3%, visando menor incorporação destes, que podem ser irritantes ou até mesmo tóxicos aos seres humanos quando em altas concentrações. De acordo com estudos de Oliveira (2008), quanto menor a concentração de tensoativos utilizados na formulação, maiores serão as gotículas, fato que se comprova neste estudo, já que a formulação NEOA 5, apresentou tamanho de gotícula maior do que todas as formulações preparadas.

Após o processo de homogeneização a alta pressão, melhores resultados foram evidenciados em todas as amostras, cabendo ressaltar que após o processo de homogeneização as amostras NEOA-2, NEOA 3, NEOA 4, NEOA 5 foram denominadas de NEOA-H 2; NEOA-H 3; NEOA-H 4; NEOA-H 5, respectivamente conforme tabela abaixo:

Tabela 5 – Resultados dos testes de caracterização da formulação proposta da nanoemulsão de óleo de araquê (*Psidium cattleyanum* Sabine - *Myrtaceae*) morfotipo vermelho: Tamanho de Gotícula (nm), Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (mV) testada com o uso de solvente orgânico após serem submetidas ao processo de homogeneização

Identificação da Amostra	Tamanho de Gotícula (nm)		PDI		Potencial Zeta (mV)	
NEOA-H 2	191,97 ±	3,92	0,378 ±	0,024	-28,57 ±	0,416
NEOA-H 3	268,77 ±	25,90	0,444 ±	0,068	-31,70 ±	1,664
NEOA-H 4	220,27 ±	2,70	0,417 ±	0,019	-31,90 ±	0,361
NEOA-H 5	185,10 ±	7,85	0,428 ±	0,005	-32,40 ±	1,852

Em comparação com os resultados anteriores, a amostra NEOA-H 3, não se manteve com os melhores resultados, pelo contrário, apresentou a maior média de tamanhos de gotículas e desvio padrão relacionado, assim como o maior resultado de PDI, sendo substituída pela amostra NEOA-H 5, com os melhores resultados no quesito média de tamanho de gotículas. Entretanto, não apresentou a melhor homogeneidade de gotículas, quando comparada a NEOA-H 2, com o menor valor de PDI. Nenhuma destas obteve índice de polidispersão dentro dos valores ideais para amostras monodispersas, entre 0,3 e 0,2 conforme especificações do fabricante. Todavia, indicam homogeneidade no tamanho das gotículas e tiveram seus potenciais de superfície aumentados para valores acima do desejado, > 30mV, conforme Oliveira (2008). Quando

amostras muito concentradas são submetidas a homogeneização muitas vezes a eficiência do equipamento pode diminuir devido a possíveis entupimentos, isto não ocorreu durante o processo de homogeneização da amostra NEOA-H 3, mas considerando esta ser a amostra com maior concentração de sólidos, pode-se sugerir que a eficiência na redução do tamanho dos glóbulos tenha diminuído nesse caso.

A partir da análise destes testes pode-se observar que tanto as amostras produzidas sem solvente orgânico, quanto as que o utilizaram em sua composição, não alcançaram resultados ideais nos parâmetros de caracterização testados, quando apenas preparadas pelo método de emulsificação espontânea, sendo necessário o acréscimo de uma etapa extra no processo de produção, a homogeneização de alta pressão.

A utilização do solvente orgânico na produção das NE deve ser avaliada, pois, como se pode identificar, a amostra NEOA 1, produzida sem solvente, apresentou melhores resultados mesmo antes do processo de homogeneização, quando comparada com a amostra correspondente, NEOA 2, a qual utilizou solvente. A média do tamanho de gotículas foi inferior, entretanto, os valores de desvio padrão foram maiores quando não havia a presença do solvente, indicando gotículas de diversos tamanhos. Dessa forma, entende-se a importância da utilização do solvente no preparo de NE pela homogeneidade de tamanho de gotículas. O índice de polidispersão foi maior na amostra com solvente orgânico, que também apresentou tamanho de gotículas maiores.

Após o processo de homogeneização de alta pressão, os melhores resultados foram apresentados pela amostra NEOA-H 2 (0,1% de óleo de araquá; 5,0% de tensoativos) quando comparados a NEOA-H 1 (0,1% de óleo de araquá e 1,25% de tensoativos), apresentando o menor valor na média de tamanhos de gotículas e um resultado maior nos valores de potencial zeta, aumentando as chances de se evitar processos de instabilidade da NE pela maior repulsão entre as gotículas dispersas.

Assim, a avaliação risco/custo-benefício deve ser considerada, já que a ausência do uso de solventes orgânicos seria o ideal, pelo risco de irritação e toxicidade que estes compostos podem proporcionar e a utilização de uma etapa extra no processo de produção da NE acarreta custos maiores para se obter melhores resultados. Salienta-se também os Princípios da Química Verde, onde encontra-se a recomendação para a não utilização de solventes orgânicos ou a se evitar solventes e auxiliares se possível; ou mesmo buscar outras alternativas que sejam mais seguras, embora grande parte da indústria farmacêutica já esteja avaliando vários critérios de impacto ambiental na escolha dos solventes (Pinto, Ribeiro, Machado, 2019). Vale destacar também que o desenvolvimento de solventes alternativos que causem menor impacto ambiental e menos riscos à saúde é uma área da química que está em desenvolvimento, com opções interessantes (Penido, Nunes, Santos, 2022). De uma forma geral, o processo de homogeneização a alta pressão se mostrou efetivo, pois a pressão empregada

durante o processo de homogeneização diminui as gotículas e torna seus tamanhos mais homogêneos, favorecendo o preparo de NE mais estáveis e comprovando a efetividade deste método.

Os valores de pH foram verificados em triplicata e os resultados são apresentados na Tabela 6. Os resultados demonstram que uma maior concentração de óleo essencial eleva a média do pH da formulação, o que é condizente com o esperado, já que compostos lipofílicos tendem a apresentar maior basicidade em decorrência de sua estrutura.

Tabela 6 – Resultados das leituras dos valores de pH das formulações propostas da nanoemulsão de óleo de araquá (*Psidium cattleianum* Sabine - *Myrtaceae*) morfotipo vermelho realizadas em triplicata

	NEOA 2	NEOA 3	NEOA 4	NEOA 5
Média	6,19 ± 0,03	6,21 ± 0,02	5,92 ± 0,03	5,93 ± 0,02

CONCLUSÃO

Considerando os resultados dos testes realizados percebe-se claramente que o emprego do processo de homogeneização a alta pressão se fez essencial para a obtenção de características viáveis destas NE. Sabendo que esta técnica ainda é onerosa, deve-se avaliar o emprego desta forma farmacêutica, já que a utilização de solventes orgânicos na produção das mesmas deve ser considerada, sendo potencialmente eficaz no processo produtivo. Mais estudos fazem-se necessários com alterações nas formulações e avaliação da estabilidade, mas este trabalho apresenta indicativos importantes na metodologia a ser utilizada na obtenção de NE do óleo essencial de araquá-vermelho. O caminho no desenvolvimento de formulações nano é desafiador, mas as vantagens potenciais que as NE apresentam, justificam o empenho no desenvolvimento destes produtos farmacêuticos inovadores.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa à primeira autora.

REFERÊNCIAS

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: [s.n.]. v. 1, 2010.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H.; KOESTER, L. S. Preparação de emulsões submicrométricas: Aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 780–788, 2008.

ALVES, M. P. *et al.* Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1–2, p. 215–220, ago. 2007.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185–199, 24 jun. 2008.

APOLINÁRIO, A. C. *et al.* Opening the pandora's box of nanomedicine: There is needed plenty of room at the bottom. **Química Nova**, v. 43, n. 2, p. 212–225, 1 fev. 2020.

BIEGELMEYER, R. *et al.* Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, set. 2011.

BORRIN, T. R. **Nanoemulsões produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP) para encapsulação de curcumina: parâmetros de produção, estabilidade físico-química e incorporação em sorvete.** Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga, p. 114. 2015.

BOUCHEMAL, K. *et al.* Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1–2, p. 241–251, 6 ago. 2004.

BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

CHIME, S. A.; KENECHUKWU, F. C.; ATTAMA, A. A. Nanoemulsions — Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery. In: **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. [s.l.] InTech, 2014.

DESOTI, V. C. *et al.* Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 15, n. 1, p. 3, abr. 2011.

DIMER, F. A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.

FETTER, M. DA R. *et al.* Propriedades funcionais de araçá-amarelo, araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) e araçá-pera (*P. acutangulum* D.C.) cultivados em Pelotas/RS. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. EE01, p. 92–95, 24 nov. 2010.

- FORGIARINI, A. *et al.* Formation of Nano-emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. **Langmuir**, v. 17, n. 7, p. 2076–2083, 1 abr. 2001.
- FORRER, M. *et al.* The antimicrobial activity of alpha-bisabolol and tea tree oil against *Solobacterium moorei*, a Gram-positive bacterium associated with halitosis. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 1, p. 10–16, jan. 2013.
- FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v. 25, n. spe, p. 1–9, dez. 2015.
- GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-Active Agents by “HLB.” **Journal of Cosmetic Science**, v. 1, p. 311–326, 1949.
- GUPTA, A. *et al.* Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016.
- HOCH, C. C. *et al.* 1,8-cineole (eucalyptol): A versatile phytochemical with therapeutic applications across multiple diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 167, p. 115467, nov. 2023.
- JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, n. 1–2, p. 81–89, mar. 1998.
- JUN, N. J. *et al.* Cytotoxic Activity of β -Caryophyllene Oxide Isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Leaf. **Records of Natural Products**, v. 5, p. 242–246, 2011.
- JÚNIOR, F. DA R. P. **Suspensões e formulações tópicas contendo nanocápsulas e micropartículas de cetoconazol: avaliação da estabilidade e atividade antimicrobiana.** Tese (Mestrado em Nanociências) - Curso de Mestrado em Nanociências. Centro Franciscano de Santa Maria. Santa Maria, p. 99. 2011.
- KLEIN, A. C. **Estudo da influência do solvente orgânico e do fluxo de injeção no controle de tamanho de nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas através do método de deslocamento de solvente.** Tese (Mestrado em Química) - Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 80. 2013.
- KOURNIATIS, L. R. *et al.* Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 295–300, 2010.
- KÜLKAMP, I. C. *et al.* Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078–2084, 2009.
- LIM, S. B.; BANERJEE, A.; ÖNYÜKSEL, H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. **Journal of Controlled Release**, v. 163, n. 1, p. 34–45, 10 out. 2012.

- MECHKOVSKI, A. AKERELE, C. O. 1992. Quality control methods for medicinal plant materials. Who/Pharm/92.559. Switzerland: World Health Organization.
- MEDINA, A. L. *et al.* Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916–922, 15 out. 2011.
- MÜLLER, N. T. G. *et al.* Análise fitoquímica das folhas de *Myrtaceae*: *Psidium cattleianum* Sabine e *Campomanesia guazumaefolia* (CAMB.) BERG. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 8, n. 14, p. 65–71, maio 2012.
- NASTITI, C. M. R. R. *et al.* Topical nano and microemulsions for skin delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, 1 dez. 2017.
- OLIVEIRA, B. R. DE. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*.** Tese (Mestrado em Ciências Farmacêutica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, p. 108. 2008.
- OURIQUE, A. F. *et al.* Lipid-Core Nanocapsules as a Nanomedicine for Parenteral Administration of Tretinoin: Development and In Vitro Antitumor Activity on Human Myeloid Leukaemia Cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 3, p. 214–223, 1 jun. 2010.
- PENIDO, R. G.; NUNES, R. C.; DOS SANTOS, E. N. Sustainable Solvents for Chemical Processes. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 3, p. 537–551, 2022.
- PEREIRA, E. DOS S. *et al.* *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p. 95–103, 30 ago. 2018.
- PEREIRA, E. DOS S. *et al.* Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine): Bioactive compounds, antioxidant activity and pancreatic lipase inhibition. **Ciência Rural**, v. 51, n. 11, 2021.
- PINTO, J. R. M.; RIBEIRO, M. G. T. C.; MACHADO, A. A. S. C. The solvent challenge in synthesis – the workup as example. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 971–982, 2019.
- ROCHA, C. H. DA. **Caracterização química de óleos essenciais de *psidium cattleianum* e seu efeito na sanidade de sementes de *phaseolus vulgaris*.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agroveterinárias. Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, p. 113. 2019.
- ROCHA, L. D. *et al.* Estudo anatômico comparativo da casca do caule do araçá-amarelo e araçá-vermelho, *Psidium cattleianum* Sabine, *Myrtaceae*. **Acta Botanica Brasílica**, v. 22, n. 4, p. 1114–1122, 2008.
- ROCHA, L. P. B. DA *et al.* Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e44101018282, 5 ago. 2021.

SANTOS, M. S.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de clorofórmio em amostras de águas saborizadas utilizando a técnica de headspace micro extração em fase sólida. **Orbital**, 1 (3), 238-250, 2009.

SARETTA, Z. C.; BRANDÃO, B. J. F. A beleza de forma sustentável: o uso de Cosméticos orgânicos. **BWS Journal**, 4, p. 1-12, jan. 2021.

SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers and intracellular drug delivery. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 16, n. 6, p. 269-275, 2012.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: ed. da UFRGS, 2004. 199-222.

TADROS, T. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, mai. 2004.

VARGAS, B. A. **Hidrogéis contendo nanoemulsões de genisteína: Estudos de formulação, permeação e retenção cutânea da genisteína**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 83. 2010.

YUKUYAMA, M. N. **Otimização de processos de obtenção de nanoemulsões contendo óleo de oliva: homogeneização a alta pressão e emulsificação empregando fase D**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 189. 2017.

ZANIN, S. M. W. *et al.* Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, v. 3, n. 1, 30 jun. 2002.

ZHAO, C. *et al.* 1,8-cineol attenuates LPS-induced acute pulmonary inflammation in mice. **Inflammation**, v. 37, n. 2, p. 566-572, 2014.